

## せん断流れ場における表面粗さに基づく溶血特性 高粘度血液を使用した実験

Hemolytic properties due to surface roughness under shear flow field  
with a highly viscous blood

丸山 修<sup>1</sup>, 江尻賢治<sup>2</sup>, 西田正浩<sup>1</sup>, 山根隆志<sup>1</sup>, 永井 文秀<sup>2</sup>, 足立吉数<sup>3</sup>, 増澤 徹<sup>2</sup>

1. 産業技術総合研究所, 2. 茨城大学工学部, 3. 茨城大学農学部

Osamu Maruyama<sup>1</sup>, Kenji Ejiri<sup>2</sup>, Masahiro Nishida<sup>1</sup>, Takashi Yamane<sup>1</sup>,

Bunshu Nagai<sup>2</sup>, Yoshikazu Adachi<sup>3</sup> and Toru Masuzawa<sup>2</sup>

1. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

2. Faculty of Engineering, Ibaraki University, 3. College of Agriculture, Ibaraki University

*Key Words:* Hemolysis, Shear stress, Surface roughness, Rotational shear stressor

### 1. はじめに

人工心臓をはじめとする遠心血液ポンプの開発において、血球破壊(溶血)特性を調べることは重要である。溶血を引き起こす原因の一つとして、血液接触面の表面粗さが関与することがわかっている。我々は、回転型せん断負荷装置を使用し、層流せん断流れ場において、表面粗さの大きさが溶血に及ぼす影響について調べてきた<sup>1), 2)</sup>。溶血を引き起こす表面粗さの閾値が設定できれば、遠心血液ポンプを開発する上で、血液接触面加工の重要な目標値を示すことができる。これまでの研究により、血液接触面に存在する表面粗さの大きさが、算術平均粗さ(Ra)で0.6 $\mu\text{m}$ と0.8 $\mu\text{m}$ の間で溶血が急増することがわかった。また、表面粗さの面積を流れ下流方向に増加させても溶血量は増加しないことが明らかとなった<sup>3)</sup>。これらの結果と、数値流体力学解析の結果から<sup>4), 5)</sup>、表面粗さが引き起こす溶血は、せん断応力の増加が関与していると示唆された。しかしながら、表面粗さに基づくせん断応力上昇の実測はできておらず、そのため溶血現象に、表面粗さがどのように関与するのかは明らかになっていない。そこで本研究では、せん断応力検出のためのトルクセンサーを、感度の高い仕様のもとと交換するとともに、トルク検出感度を高めるためと、溶血量微量変化を感度よく分析するために、ウシ血液にデキストランを添加し、高粘度血液として使用することで、表面粗さの大きさおよび面積の増加に伴うせん断応力増加と溶血量増加の定量的相関を明らかにすることを目的とした。

### 2. 実験方法

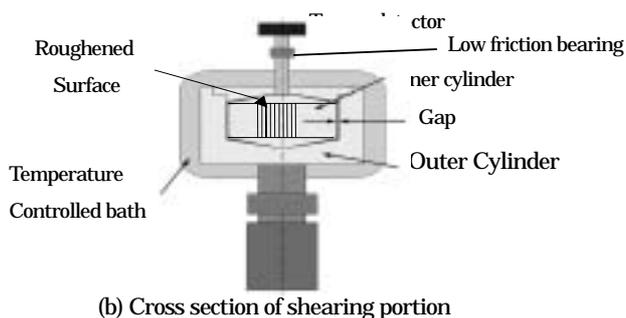
#### 2-1 回転型せん断負荷装置の構造と表面粗さの付加

実験に使用する回転型せん断負荷装置の外観図を Fig.1(a)に、せん断負荷部の断面図を Fig.1(b)示した。せん断負荷部は、内筒と外筒の二重円筒からなり、上下が円錐型、中央部が円筒部となっている。せん断負荷部の流れを安定させるため、内筒を固定し、外筒を回転さ

せて、試料にせん断負荷を与える構造である<sup>6)</sup>。この内筒の中央円筒部全周の10%面積相当分に、目標Raが0.1, 0.4, 0.6および0.8 $\mu\text{m}$ となるように、工作機械であるサンドブラスタにより加工痕を付加した。また、目標Ra0.8 $\mu\text{m}$ の表面粗さを円筒部の10%, 50%および100%となるように円周方向に粗さ面積を伸ばすように加工痕を付加した(Table.1)。付加後の加工痕のRaを表面粗さ計で実測した。



(a) Observation of Rotational Shear Stressor



(b) Cross section of shearing portion

Fig.1 Rotational shear stressor developed at AIST; (a) Photo of rotational shear stressor, (b) Cross section of shearing portion and inner cylinders with roughened surface.

Table.1 Inner cylinders with roughened surface

| 内筒ID | HC         | H1    | H2    | H3    |
|------|------------|-------|-------|-------|
|      |            |       |       |       |
| 目標Ra | 0.1μm      | 0.4μm | 0.6μm | 0.8μm |
| 付加面積 | すべて円周部の10% |       |       |       |
| 加工方法 | すべてサンドブラスタ |       |       |       |

| 内筒ID | H3         | H4  | H5   |
|------|------------|-----|------|
|      |            |     |      |
| 目標Ra | すべてRa0.8μm |     |      |
| 付加面積 | 10%        | 50% | 100% |
| 加工方法 | すべてサンドブラスタ |     |      |

### 2-2 高粘度血液の調整方法

デキストラン (MM425,000 ~ 525,000) と生理食塩水を重量比が 1:2 となるように混ぜ合わせて調整した。試薬として購入したウシ保存血液 (屠殺から使用まで約 24 時間経過) に、このデキストラン水溶液および血液の自己血漿を添加し、最終的にヘマトクリット (Ht) 値が 30% で、目標粘度が 20mPa・s を超える高粘度試験血液を調製した。また、対照として、デキストランを添加していない無添加血液についても Ht が 30% となるように調整した。調製した試験血液は、回転粘度計を使用して、37 °C、9.6 ~ 383s<sup>-1</sup> のずり速度におけるみかけ粘度を測定した。

### 2-3 回転型せん断負荷装置を使用した溶血試験

2-2 で調製した 2 種類の血液を、せん断負荷部に充填し、Table.1 に記した内筒について、せん断速度 3,750s<sup>-1</sup> (1,000rpm)、37 °C、30 分の実験条件でせん断負荷をかけ、実験後の血液を回収し、遠心分

離によって血漿を採取して、血漿中の遊離ヘモグロビン濃度を、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンを用いる比色定量により溶血量を算出した。また、せん断負荷時のトルク値を測定した。

## 3. 実験結果および考察

### 3-1 内筒に付加した表面粗さの測定

内筒円筒部に付加した加工痕の顕微鏡写真を Fig.2 に示した。

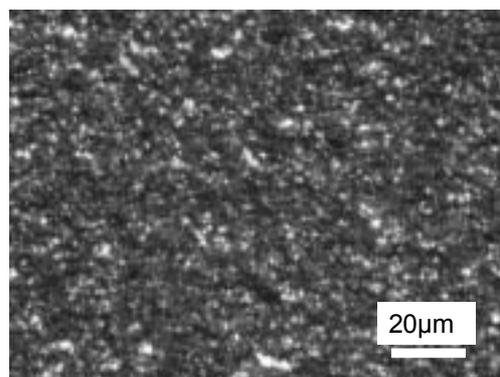


Fig.2 Microscopic observation of roughened surface with Ra 0.8μm.

顕微鏡で観察すると、Fig.2(a)の結果から、サンドブラスタで付加した粗さ表面は不規則に凹凸が存在することがわかった。使用した内筒について、加工痕の Ra を実測した結果を Table.2 に示した。

Table.2 Measurement of roughened surface of inner cylinders

| ID of Inner Cylinders (μm) | Target Ra (μm) | Ra area at cylinder part (%) | Measured Ra (μm) |
|----------------------------|----------------|------------------------------|------------------|
| HC                         | 0.1            | 10                           | 0.1              |
| H1                         | 0.4            | 10                           | 0.2              |
| H2                         | 0.6            | 10                           | 0.5              |
| H3                         | 0.8            | 10                           | 0.6              |
| H4                         | 0.8            | 50                           | 0.6              |
| H5                         | 0.8            | 100                          | 0.6              |

加工痕を実測した Ra は目標 Ra よりわずかに小さい値となったが (HC ~ H5)、粗さ面積を変えた内筒 (H3 ~ H5) はすべて同じ Ra (0.6μm) であった。

### 3-2 試験血液の粘度測定

デキストラン添加血液および無添加血液について、各ずり速度における試験血液の見かけ粘度を Fig.3 に示した。両試験血液ともに、ずり速度の増加に伴い、みかけ粘度は減少し、チキソトロピーの性質を示した。結果として、回転粘度計での最高ずり速度 383s<sup>-1</sup> におけるデキストラン添加血液のみかけ粘度は、23.66mPa・s、無添加の血液では 3.467mPa・s あり、デキストラン添加血液の粘度は無添加血液の 6.8 倍高い値となった。

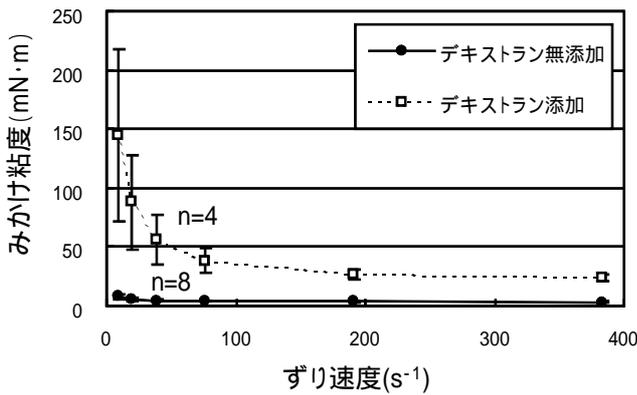


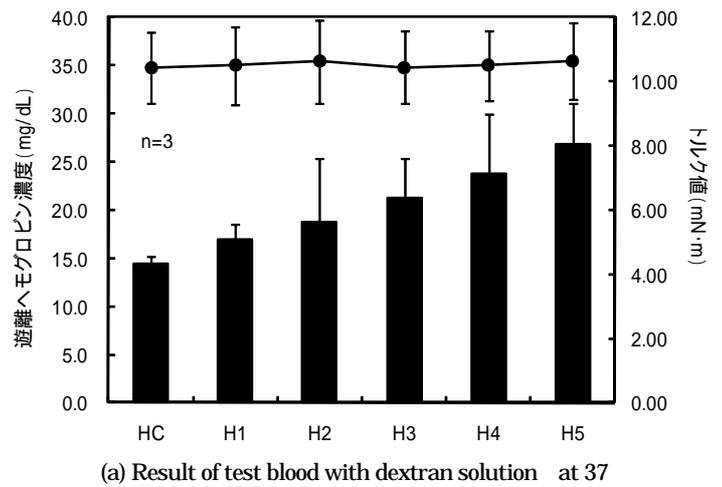
Fig.3 Apparent viscosities of tested blood with/without dextran solution prepared from purchase bovine blood

### 3-3 セン断負荷装置を用いた溶血試験

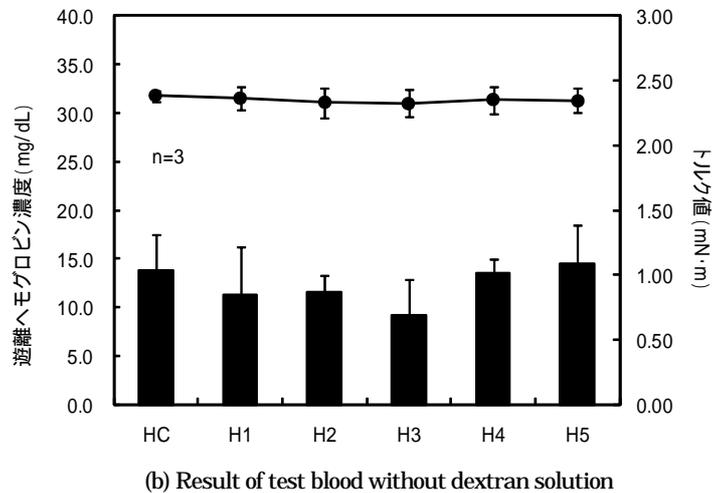
サンドプラスタで加工した HC ~ H5 内筒を使用して、デキストラン添加血液および無添加血液について、各内筒における溶血量およびトルク値を、それぞれ Fig.4(a)および(b)に示した。Fig.4(a)の結果から、デキストラン添加血液を用いた実験では、実測 Ra が 0.1 $\mu$ m から 0.6 $\mu$ m まで増加したとき、溶血量は 14.4mg/dL ~ 21.2mg/dL まで増加した (HC ~ H3)。3 回の繰り返し実験であったが、Ra の増加に関しては、有意差は得られなかった。このときのトルク値は 10.4 ~ 10.6mN·m で有意差は得られず、ほぼ一定の値であった。さらに Ra の面積増加では、溶血量は 21.2mg/dL ~ 26.8mg/dL まで増加し (H3 ~ H5)、トルク値は 10.4 ~ 10.6mN·m で有意差はなくほぼ一定の値であった。

Fig.3(b)の結果から、デキストラン無添加血液では、実測 Ra が 0.1 から 0.6 $\mu$ m まで増加したときの溶血量は (HC ~ H3)、13.7mg/dL から 9.2mg/dL に減少した。トルク値も 2.38 ~ 2.32mN·m とわずかに減少傾向であった。この溶血量の減少、およびトルク値の減少についても有意差はなかった。また、Ra の面積増加については、溶血量は 9.2 ~ 14.4mg/dL に増加した。これに伴うトルク値は、2.32mN·m ~ 2.34mN·m とわずかに増加を示した (H3 ~ H5)。

上記の実験結果から次のように考察している。本実験では、繰り返し実験数が 3 回と少ないため、再現性については再確認が必要があるが、デキストラン添加血液に関しては表面粗さの大きさの増加、および面積の増加に対して、溶血量は有意差はないものの増加する傾向を示した。Fig.4(a)の結果より、HC 内筒と H5 内筒とでは、溶血量の差は 12.4mg/dL であり、HC から H5 には 1.9 倍に溶血量が増加した結果となった。これに対して、トルク値、すなわちせん断応力の増加量は、わずか 0.2mN·m であり、増加率に換算すると 1.9% であった。せん断応力の増加に対するトルク値の上昇について考えてみると、Fig.4(a)および Fig.4(b)の HC 内筒のトルク値は、それぞれ 10.4mN·m、2.9mN·m であり、デキストラン添加血液のトルク値は、無添加血液の 3.6 倍であった。一方で、回転粘度計によるずり速度 383s<sup>-1</sup> におけるみかけ粘度は、デキストラン添加血液で 23.66mPa·s、無添加血液で 3.467mPa·s であり、両者の比は 6.8 倍であった。した



(a) Result of test blood with dextran solution at 37



(b) Result of test blood without dextran solution

Fig.4 Concentration of free hemoglobin and torque values for the inner cylinders from HC to H5 with different level or area of surface roughness at 37

がって、回転型せん断負荷装置によるせん断応力の検出が回転粘度計の約 1/2 ではあるものの、試験血液の粘度増加に伴って、トルク値は増加することが確認できた。しかしながら、Fig.4(a)の結果では、溶血量の増加に対してせん断応力が追隨していないことから考えると、少なくとも Ra の大きさの増加および Ra の面積の増加に対する溶血は、表面粗さに基づくせん断応力が全体的に増加し、これによって溶血しているのではないことが考えられる。一方で、Fig.4(b)の結果から、デキストラン無添加の血液では、表面粗さの大きさも面積も溶血に影響を与えなかったと考えられる。従って、サンドプラスタで付加した規則性のない表面粗さ上に 37 の血液のせん断流れがあった場合、ネイティブの血液では表面粗さの影響を受けることなく一定量で溶血し、増粘した場合には、増粘に基づくせん断応力増加分によって、表面粗さの大きさおよび面積増加に対応して溶血量も増加すると考えている。Fig.4(a)の溶血量から Fig.4(b)の溶血

量を差し引いた溶血量を Fig.5 に示した。この溶血量の差分が、高粘度血液に基づく表面粗さによる溶血と考えている。

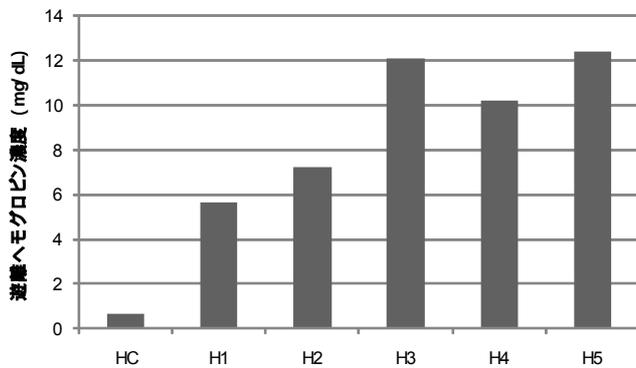


Fig.4 Concentration difference between viscous blood and native blood for the inner cylinders from HC to H5 with different level or area of surface roughness at 37

しかし、この溶血量増加に、表面粗さに起因するせん断応力増加は関与していない。Fig.4(a)とFig.4(b)のHC内筒の溶血量を比較すると、前者は14.4mg/dLで、後者は13.7mg/dLですなわち、トルク値で3.6倍高いにもかかわらず、溶血量に反映されていないことがわかった。これは、単純にせん断応力の数値が重要なのではなく、せん断速度の増加による赤血球の変形を伴うことが重要であると考えている。我々のこれまでの研究で、本せん断負荷装置を使用した実験において、せん断速度の約2乗に比例して溶血量が増加していることを証明している<sup>3)</sup>。当初は、感度良いトルク値の検出とともに、感度良い溶血量の検出を試みたが、溶血量には影響しなかった。

高粘度血液を使用した本実験系では、せん断流れ場における表面粗さに基づく溶血において、表面粗さに起因するせん断応力増加は確認できず、溶血量との定量的相関を得ることはできなかった。しかし、本実験により、表面粗さがせん断流れ場全体のせん断応力を増加しているのではないことが明らかになった。従って、せん断流れ場内で均一に溶血量が増加するのではなく、せん断流れ場における特異箇所、恐らく表面粗さ近傍でスポット的に溶血が生じていると考えているが、今後この問題を詳細に調べ、明らかにしていきたい。

#### 4.まとめ

せん断流れ場における表面粗さに基づく溶血は、高粘度血液を使用した本実験結果から、表面粗さがせん断流れ場内で均一に高せん断応力を引き起こすのではなく、表面粗さ近傍の流体力学的環境に起因しているものと考えているが、検証が必要である。

#### 参考文献

- 1) 丸山ら, ライフサポート, Vol.14, No.4, 2002, 129-136
- 2) O. Maruyama et al, *Journal of Artificial Organs*, Vol.8, 2005,

228-236

3) O. Maruyama et al, *Artificial Organs*, Vol.30, No.5, 2006, 365-370

4) 西田ら, 第24回ライフサポート学会大会講演予稿集, 2008, 92

5) 西田ら, 茨城講演会論文集, 2009, 269-270

6) Taylor et al, *Proc. Roy. Soc. A*, 1936, 157, 546-564